

ZELLKINETISCHE UNTERSUCHUNGEN
ZUR RESISTENZTESTUNG

Dimitrios Palaras

1980

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 26 81 77



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548319_0005

Aus der III. Medizinischen Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. W. Wilmanns

ZELLKINETISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR RESISTENZTESTUNG

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Dimitrios Palaras

aus

Anixis/Griechenland

München 1980

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Ehrhart

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Wilmanns

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 22.5.1980



Ich danke meinem Doktorvater
Herrn Dr. med. K. Possinger,
weiterhin gilt mein Dank
Herrn Prof. Dr. med. H. Ehrhart
für sein Votum und
Frau L. Heimerl für ihre medizinisch-
technische Unterstützung

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<u>EINLEITUNG</u>	1
1. <u>BESTIMMUNG DER DAUER DES GENERATIONSZYKLUS UND SEINER TEILPHASEN VON L 1210 MÄUSE-LEUKÄMIEZELLEN</u>	4
1.1. Einleitung	4
1.2. Material	7
1.3. Methodik	8
1.4. Ergebnisse	11
1.5. Diskussion	16
2. <u>VALIDITÄTSPRÜFUNG DES IN-VITRO-KURZZEITTESTS</u>	19
2.1. Einleitung	19
2.2. Material	23
2.3. Methodik	25
2.4. Ergebnisse	30
2.5. Diskussion	33

3. BESTIMMUNG DER ZYTOTOXISCHEN WIRKUNG VON MEDIKAMENTEN AUF DIE L 1210 MÄUSE-LEUKÄMIE- ZELLEN MIT HILFE DER γ -RELEASESTECHNIK	48
3.1. Einleitung	48
3.2. Methodik	50
3.3. Material	58
3.4. Ergebnisse	59
3.5. Diskussion	61
<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	63
<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	65

EINLEITUNG

Die medikamentöse Behandlung maligner Geschwülste erfolgt heute in der Regel nach empirisch gewonnenen Therapieschemata.

Durch zahlreiche experimentelle und klinische Untersuchungen ist bekannt, daß Tumoren oft trotz gleicher Lokalisation und Histologie different auf das gleiche Medikament reagieren (LIMBURG und KRAHE, 1964; KAUFMANN und Mit., 1971; MORASCA und Mit., 1973; TANNENBERGER und Mit., 1973; VOLM und Mit., 1973).

Der Erfolg einer zytostatischen Therapie ist deshalb im Individualfall nicht vorherzusagen. Es können Wochen vergehen, bevor man aus dem Verlauf des Tumorwachstums auf die therapeutische Wirksamkeit der gewählten Zytostatika rückschließen kann.

Es wäre deshalb von großer Wichtigkeit, vor Behandlungsbeginn über die zytostatikabedingte Beeinflußbarkeit des Tumors Auskunft zu erhalten.

So könnten Medikamente, die keine zytostatische Wirkung auf den Tumor entfalten und den Patienten nur zusätzlich durch die unerwünschten Nebenwirkungen wie Neurotoxizität, Knochenmark- und Schleimhauttoxizität, Beeinträchtigung der immunologischen Abwehrlage und Reduzierung des Allgemeinzustandes belasten, bereits prätherapeutisch ausgeschlossen werden.

Ausgehend von dieser Problematik werden seit Jahren Versuche angestellt, prätherapeutisch durch In-vitro-Tests die Sensibilität bzw. die Resistenz von Tumorzellen gegenüber Zytostatika vorauszusagen (COBB et al., 1961; LIMBURG und KRAHE, 1964; BICKIS et al. 1966; SEIDEL, 1969; KUMMER, 1970; TANNENBERGER, 1968; VOLM und Mit., 1970; VOLM und Mit., 1973).

Keiner dieser Tests bietet allerdings die Möglichkeit, mit ausreichender Sicherheit das Ansprechen eines Tumors auf Chemotherapeutika vorauszusagen, da die vorgeschlagenen In-vitro-Tests das tatsächliche In-vivo-Verhalten von Tumorzellen wie zellkinetische Heterogenität, Unterschiede in den zellkinetischen Daten der Tumorzellen, Verteilungs- und Ausscheidungsvorgänge im Organismus nicht nachvollziehen können.

VOLM und Mit. entwickelten 1970 einen In-vitro-Test, mit dem bei schnell proliferierenden Tumoren eine prätherapeutische Resistenz bestimmt werden kann, wobei unphysiologische Parameter in Kauf genommen werden wie extrem hohe Zytostatikakonzentrationen, Ausschluß von Abbau-, Verteilungs- und Reparationsvorgänge.

Ziel folgender Arbeit war es, an einem experimentellen Tumormodell

1. als Voraussetzung für die Interpretation einer In-vitro-

Testung die Proliferationsparameter des verwendeten Tumor-
materials zu bestimmen,

2. die Validität eines In-vitro-Vorhersagetests, dem die
quantitative Änderung des Nucleinsäurestoffwechsels als
Indikator eines zytostatischen Effekts in einer Zellpopu-
lation nach Kurzzeitinkubation mit Zytostatika zugrunde
liegt, zu prüfen.
3. mit Hilfe der γ -Releasetechnik die zytotoxische Wirkung
der in-vitro eingesetzten Substanzen auf die Tumorzellen
zu erfassen.

1. BESTIMMUNG DER DAUER DES GENERATIONSZYKLUS UND SEINER TEIL- PHASEN VON L 1210 MÄUSE-LEUKÄMIEZELLEN

1.1. Einleitung

Zu den wesentlichen Voraussetzungen für die Beurteilung und Interpretation von Informationen, die durch In-vitro-Tests gewonnen werden, gehören:

- a) proliferationskinetische Daten der Tumorzellen und
- b) der pharmakologische Wirkungsmechanismus der verwendeten Zytostatika.

Die Kenntnis der Proliferationsparameter ist für die Beurteilung der Beeinflussbarkeit durch Zytostatika deshalb von Bedeutung, da diese Medikamente überwiegend auf proliferierende Zellen und insbesondere auf bestimmte Zellzyklusphasen wirken (MAURO and MADOCK-JONES, 1970; SKIPPER, 1971; DE VITA, 1971; RAJEWSKY, 1972; EHRHART, 1973).

Der größte Teil der heutigen Kenntnisse über die Wachstumskinetik von Zellpopulationen beruht auf autoradiographischen

Untersuchungen mit radioaktivem Thymidin.

Die Wachstumscharakterisierung nach HOWARD und PELC (1953) beschreibt den Zellzyklus wie folgt:

1. die postmitotische, präsynthetische Phase (G1-Phase)
2. die DNS-Synthese-Phase (S-Phase)
3. die postsynthetische Phase (G2-Phase) und
4. die Mitosephase.

Das derzeit gebräuchlichste Untersuchungsverfahren, die Länge des Generationszyklus und seine Teilphasen zu bestimmen, ist die Auszählung radioaktiv markierter Mitosen, wie sie von QUASTLER und SHERMAN (1959) angegeben worden ist:

Durch die Pulsmarkierung einer asynchronen Zellpopulation werden spezifisch solche Zellen markiert, die sich gerade in der DNS-Synthesephase befinden.

Diese Zellen durchwandern wie alle anderen Zellen der Zellkultur die einzelnen Teilphasen des Generationszyklus.

Wenn man zu verschiedenen Zeiten Zellen aus dieser Kultur herausnimmt, autoradiographische Präparate anfertigt und den Prozentsatz der markierten Mitosen zu den unmarkierten bestimmt, kann man den Durchgang der markierten Zellen durch die erste und zweite Mitose sichtbar machen.

Wird der Prozentsatz der markierten Mitosen zu den unmarkierten als Zeitfunktion aufgetragen, so erhält man einen wellen-

förmigen Kurvenverlauf mit zwei Maxima, aus dem die Generationszeit und die Dauer ihrer Teilphasen entnommen werden kann (QUASTLER und SHERMAN, 1959; HEMPEL, 1968; SCHULZE, 1968; STEEL, 1972; GILBERT, 1972).

Ein anderer wichtiger Parameter zur Charakterisierung des Proliferationsverhaltens der L 1210 Zellen ist die Bestimmung des ^3H -Thymidin-Markierungsindex (T.M.I.), wobei nach der Pulsmarkierung mit ^3H -Thymidin das Verhältnis der ^3H markierten Zellkerne zur Gesamtzahl ermittelt wird.

1.2. Material

Tumormaterial:

L 1210 Leukämiezellen

Autoradiographie-Material:

Methanol 100%ig und Aqua dest.,

0,5%ige Gelatine,

70%iges und 96%iges Äthanol,

Schneideplatte,

Kodak AR 10 Strippingfilm.

Entwicklermaterial:

36 g Na-Sulfat,

9 g Amidol,

16 ml Kaliumbromid,

2 l Aqua dest.

Fixierungsmaterial:

60 g Kalium-Disulfid,

600 g Na-Thiosulfat-5-hydrat,

2 g Chromalaun,

2 l Aqua dest.

Markierungssubstanz:

³H-Thymidin spez. Akt. 5 Ci/mM der Fa. Radiochemical
Centre, Amersham, England.

1.3. Methodik

Zu ca. 4×10^6 L 1210 Leukämiezellen, die in 2 ml TC 199 Nährlösung suspendiert waren, wurden 10 μCi ^3H -Thymidin gegeben und bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Nach 1 Std. wurde das Zellsuspendat mit 800 U/min 5 min lang zentrifugiert, der Überstand abpipettiert, die im Sediment verbliebenen Tumorzellen dreimal mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und in Nährlösung resuspendiert.

Nach Standardisierung der Zellen auf 1 Mill./ml (NEUBAUER ZÄHKAMMER) erfolgte die Zugabe von 0,1 mg Cephalotin^R (LILLY, Gießen), um ein bakterielles Wachstum zu verhindern.

Nach 1, 2, 4, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 20, 22 und 24 Stunden wurden aus diesem Ansatz jeweils 2 ml (= 2 Mill. Zellen) entnommen und bei 500 U/min 5 min lang abzentrifugiert.

Vom Bodensatz wurden dann Zellausstriche angefertigt.

Die Herstellung der autoradiographischen Präparate erfolgte nach der Stripping-Methode:

Nach Lufttrocknung wurden die Ausstriche mit 100%igem Methanol fixiert und anschließend in destilliertem Wasser gespült. Die Rückseite der Objektträger wurde dann mit 0,5%iger Gelatine bestrichen, damit später der Film besser haftet.

Anschließend erfolgte in der Dunkelkammer die Beschichtung der Präparate mit Stripping AR 10 der Fa. Kodak (AUTORADIOGRAPHIC STRIPPING PLATES).

Nachdem die Filmplatte für 5 min in 70%igem Äthanol eingebracht worden war, wurde sie in 8 gleiche Teile geteilt.

Um die Filmschicht ablösen zu können, wurden die Platten für 2 min in 96%iges Äthanol getaucht und in Aqua dest. auf die Objektträger aufgezogen.

Zuletzt wurden die Präparate 3 Stunden lang im Trockenschrank getrocknet und anschließend in lichtdichten Bakelitbehältern für 3 Wochen bei 4° C exponiert.

Nach Entwicklung und Fixierung der Präparate - Einlage für 20 min bei 18° C ins Fixierbad, 2 Std. Wässerung und anschließend Trocknung - erfolgte 25 min lang die Färbung mit Giemsa-Lösung. Durch Auszählung wurde der Prozentsatz markierter L 1210 Zellkerne = Thymidinmarkierungsindex (TMI) und der Prozentsatz markierter Mitosen bestimmt, wobei nur Kerne mit mehr als 5 Silberkörnern gewertet wurden.

Pro Präparat wurden jeweils 100 Mitosen gezählt und der Anteil der mit ³H-Thymidin markierten Mitosen bestimmt. Nur Kerne der späten Prophase bis zur frühen Telophase fanden Berücksichtigung.

Anschließend erfolgte die Konstruktion der Prozentkurve mar-

kierter Mitosen. Die mit + gezeichneten Punkte stellen die experimentell gemessenen Werte dar, während die mit o markierten Punkte konstruierte Punkte sind.

Dabei wurden jeweils 3 aufeinanderfolgende Punkte als Endpunkte eines Dreiecks aufgefaßt, und der Schnittpunkt der Winkelhalbierenden ergab den konstruierten Punkt.

1.4. Ergebnisse

Aus der Kurve (Abb. 1) kann dann die Dauer des Generationszyklus T und seiner Teilphasen abgelesen werden.

Der Zeitraum zwischen der Thymidinpulsmarkierung und dem Auftreten der ersten markierten Mitosen entspricht der Dauer der prämitotischen G_2 -Phase t_{G2} .

Die Zeit zwischen der Pulsmarkierung und dem Erreichen des ersten Maximums gibt den Maximalwert für die Dauer von $t_{G2} + t_M$ an.

Die Dauer vom Beginn des Anstiegs der Kurve bis zur Erreichung des Hundertprozentwertes entspricht der Mitosedauer.

Der Zeitintervall zwischen den Scheitelpunkten des ersten und zweiten Kurvenmaximums zeigt die Generationsdauer t_C an.

Die Breite der ersten Welle in Höhe der 50%igen Markierung der Mitosen gibt die Dauer der DNS-Synthesephase t_S wieder (QUASTLER und SHERMAN, 1959; BASERGA, 1965; RAJEWSKY, 1966; HEMPEL, 1968; SCHULZE, 1968).

Aus Tabelle 1 sind somit folgende Werte zu entnehmen:
(Tab. 1).

Der Thymidinmarkierungsindex erreichte bei dieser Zellpopulation 52%. Dabei wurde nach der Pulsmarkierung mit 3H -Thy-

midin von je 1000 Zellen der Anteil ^3H markierter Zellkerne bestimmt.

Bei Kenntnis der S-Phasendauer und des TMI ist nach STEEL (1968) die Verdoppelungszeit T_D nach der Formel

$$T_D = \frac{T_S}{TMI}$$

möglich.

Dabei ist ein Korrekturfaktor für die unterschiedliche Verteilung der Zellen innerhalb des Zellzyklus in einer exponentiell wachsenden Zellpopulation.

Nach STEEL kann für die meisten Tumoren = 0,8 eingesetzt werden. Der Fehler beträgt dabei $\pm 10\%$.

In diesem Falle beträgt die errechnete Verdoppelungszeit T_D

$$T_D = 0,8 \frac{8,8}{52} 100 = 13,5 \text{ Std.}$$

Wenn man den Verlauf der Kurve markierter Mitosen betrachtet, so sieht man, daß

1. der Prozentsatz der markierten Mitosen den Hundertprozentwert nicht erreicht,
2. der auf- und absteigende Ast der ersten und insbesondere

der zweiten Kurvenwelle nicht linear verläuft und
3. die zweite Welle sich unmittelbar an die erste anschließt, unscharf und flacher ausfällt, und deren Werte einer größeren Streuung unterliegen.

Prozent markierter Mitosen

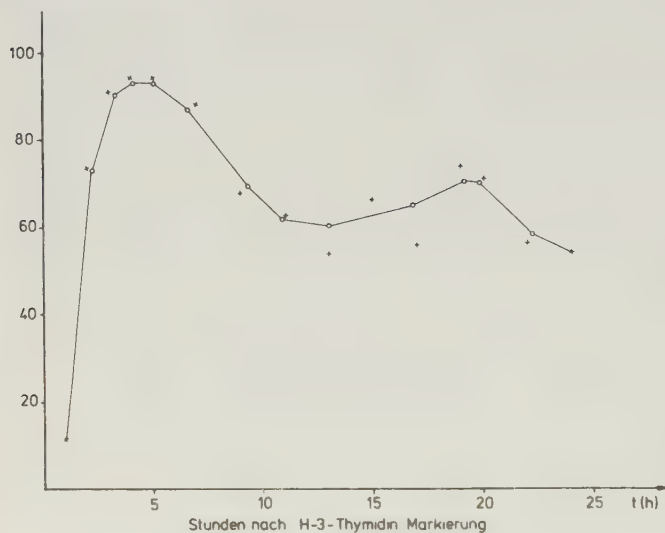


Abb. 1 Prozentsatz markierter Mitosen zu verschiedenen Zeiten nach einstündiger Inkubation mit H-3-Thymidin bei L 1210-Mause-Leukamiezellen

t_{G2} (Minimum)	=	0,8 Stunden
$t_{G2} + t_M$ (Maximum)	=	3,9 Stunden
t_S (häufigst)	=	8,8 Stunden
t_C (häufigst)	=	15,0 Stunden

Tab. 1: Dauer der prämitotischen Ruhephase (t_{G2}),
der prämitotischen Ruhephase + Mitosephase ($t_{G2}+t_M$),
der DNS-Synthesephase (t_S) und der gesamten Ge-
nerationszeit (t_C) bei L 1210 Leukämiezellen er-
mittelt nach der QUASTLER-SHERMAN-Methode

1.4. Diskussion

Die Bestimmung der Generationszeit T und der Dauer der Teilabschnitte des Zellzyklus der L 1210 Leukämiezellen erfolgte mit Hilfe des Präcursors ^3H -Thymidin nach der von QUASTLER und SHERMAN 1959 entwickelten Methode.

Die mittlere Generationszeit dauerte 15 Stunden, die (G_2 +M)-Phase 3,9 Stunden und die G_1 -Phase 2,3 Stunden. Die DNS-Synthesephase betrug 8,8 Stunden und entsprach somit 58% des Generationszyklus.

Der Thymidinmarkierungsindex (T.M.I.) erreichte 52% und die errechnete Verdoppelungszeit betrug 13,5 Stunden.

Die gefundene Generationszeit und die Länge ihrer Teilphasen sind als Durchschnittswerte zu betrachten. Ihre Dauer kann in weite Grenzen streuen, wobei Zellen mit sehr langer oder sehr kurzer Generationszeit vorkommen können. Wenn alle Zellen der Zellpopulation gleiche Generationsdauer hätten, dann müßte es zwei trapezförmige Wellen geben.

Der Steigungsgrad der Kurve und die Unschärfe der zweiten Welle sind nach BASERGA (1965) und RAJEWSKY (1972) ein Maß für die Streuung der Zellzykluszeiten. Nach BASERGA (1965) lassen sich bei Zellkulturen die Schwankungen der t_C -Zeit

vor allem auf biologische Schwankungen der G_1 -Dauer zurückführen, während die G_2 - und S-Phasendauer im wesentlichen konstant bleibt. Das nicht linear verlaufende Auf- und Absteigen der ersten und insbesondere der zweiten Kurvenwelle und die im Vergleich zur ersten kleiner, unschärfer und flacher ausgefallene zweite Kurvenwelle ist somit Ausdruck einer erheblichen Streuung der t_C -Zeiten innerhalb der L 1210 Zellpopulation.

Das Nichterreichen der Hundertprozentmarke der markierten Mitosen könnte so erklärt werden, daß ein Teil der Zellen eine so kurze Generationszeit hat, daß sie schon die G_1 -Phase erreicht haben, bevor die Hauptmasse der übrigen Zellen in die Mitosephase eingetreten ist.

Der erhaltene hohe Thymidinmarkierungsindex von 52% entspricht dem hohen Proliferationsgrad der L 1210 Zellen. Er spiegelt die Wahrscheinlichkeit wieder, mit der eine Zelle der betrachteten Population in der S-Phase angetroffen werden kann.

Zwischen Proliferationskinetik und In-vitro-Inkorporation von Nucleinsäurepräkursoren besteht eine direkte Beziehung. Bei schnell proliferierenden Tumoren ist die Nucleinsäuresynthese groß und die im In-vitro-Test erzielten zytostatischen Effekte leichter nachzuweisen. (SKIPPER, 1971; VOLM

und Mit., 1976).

Aus der Generationszeit von 15 Stunden der berechneten Tumorverdoppelungszeit von 13,5 Stunden und dem Thymidinmarkierungsindex von 52% kann geschlossen werden, daß sich die vorliegende L 1210 Zellkultur in einer exponentiellen Wachstumsphase befindet.

Vorliegende L 1210 Leukämiezellpopulation ist somit ein geeignetes Modell, die Hemmung der Nucleinsäuresynthese durch Zytostatika innerhalb von 3 Stunden zu bestimmen.

2. VALIDITÄTSPRÜFUNG DES IN-VITRO-KURZZEITTESTS

2.1. Einleitung

Es werden verschiedene In-vitro-Vorhersagetests beschrieben, mit denen die Sensibilität bzw. Resistenz der Tumoren gegen Zytostatika bestimmt werden können.

Die wichtigsten In-vitro-Testsysteme sind die Anzüchtung der zu prüfenden Tumorzellen in einer Gewebekultur und die Kurzinkubation von Tumorzellsuspensionen, wobei die Wirkung der Zytostatika auf den DNS- bzw. RNS-Stoffwechsel mittels radioaktiv markierter Präkursoren bestimmt wird (WRIGHT et al. 1957; COBB et al., 1961; WOLBERG und BROWN, 1962; LIMBURG und KRAHE, 1964; BICKIS und HENDERSON, 1966; TANNENBERGER, 1968; VOLM et al., 1970).

Bei den Gewebekulturmethode n werden Tumorzellen in-vitro gezüchtet und nach Inkubation mit Zytostatika morphologische und in der letzten Zeit auch biochemische Parameter als Kriterien für die Wirksamkeit dieser Substanzen herangezogen. EAGLE (1956), TOPLIN (1959), COBB und Mit. (1961) benutzten

vor allem morphologische Kriterien eines zytostatischen Effekts wie Verklumpung von Tumorzellen, Vacuolisierung, Pyknose, chromosomale Veränderungen und Karrhyorhexis. MC ALLISTER et al. (1959) und MORASKA et al. (1965) nahmen die Verminderung der Zellzahl vor und nach einer Zytostatikaapplikation als Maß für ihre Wirksamkeit. GRADY et al. (1960) bestimmten die Zellvermehrungsfähigkeit einer Zellkultur, indem sie die Zellen mit Kristallviolett färbten und anschließend die Farbintensität maßen.

EAGLE und FOLEY (1958) bestimmten den Proteingehalt einer mit Antitumorsubstanzen behandelten Zellpopulation und verglichen diese mit dem Proteingehalt nicht mit Zytostatika behandelter Kontrollansätze.

Die Anwendung morphologischer, physikalischer und chemischer Parameter als Indikator eines zytostatischen Effekts brachte jedoch methodisch bedingt subjektive, unzuverlässige und ungenaue Ergebnisse.

Um objektivere Bewertungen für die Beurteilung des zytostatischen Effekts zu erhalten, wurden zunehmend biochemische Parameter herangezogen.

MIYAMURA (1956) und später DI PAOLO (1963) bestimmten die Dehydrogenaseaktivität der Tumorzellen, wobei eine Veränderung der Dehydrogenaseaktivität nach Gabe von Zytostatika über die

Entfärbung von Methylenblau sichtbar gemacht wurde.

Eine weitere Verbesserung brachte die Verwendung von radioaktiv markierten Stoffwechselpräkursoren in Zellkulturen wie ^3H -Thymidin, ^3H -Uridin und ^3H -Leucin. Deren Einbauhemmung nach Zytostatikaapplikation wurde als Maß für die zytostatische Wirksamkeit betrachtet. Diese Stoffe werden von den Zellen genauso inkorporiert wie die entsprechenden unmarkierten Substanzen.

Die Langzeitkultur, mit der die meisten dieser Untersuchungen durchgeführt wurden, hat methodische Nachteile, wie z. B. begrenzte Anzüchtbarkeit des Tumorgewebes, Änderung des proliferativen Zustandes der Tumorzellen und das Wachsen von Fibroblasten.

Aufgrund dessen ist ein In-vitro-In-vivo-Vergleich problematisch.

Die Kurzzeitkultur dagegen ist methodisch einfacher, weniger zeitaufwendig und für klinische Zwecke brauchbar (BICKIS und HENDERSON, 1966; VOLM et al., 1970; SEIDEL, 1969; RABES und JANTSCH, 1970; KUMMER, 1971; BASTERT, 1975; POSSINGER et al., 1976).

Beim Kurzzeittest wird davon ausgegangen, daß fast jedes klinisch gebräuchliche Zytostatikum bestimmte Synthesewege der Nucleinsäure blockiert. Die Tumorzellen werden deshalb

mit radioaktiv markierten Nucleinsäurevorläufern versetzt und deren quantitative Einbauhemmung nach Zytostatikagabe an autoradiographischen Präparaten oder mit automatischen Szintillationszählern gemessen.

Die gemessene Hemmung der Präkursorenincorporation in Anwesenheit von Zytostatika stellt ein objektives Maß für den Effekt der Antitumorsubstanzen dar.

Bei menschlichen Tumoren ist, bedingt durch die Variabilität des Tumorgewebes und der methodischen Schwierigkeiten bei der Herstellung der Tumorzellsuspensionen, die Validität des Kurzzeittests nur schwer zu prüfen. Wir haben deswegen ein einfaches, gut überschaubares Tumormodell benutzt, um die Wirkung von 6 verschiedenen Zytostatika auf die Nucleinsäuresynthese zu testen.

Als Tumormaterial verwendeten wir für die In-vitro-Versuche L 1210 Leukämiezellen.

Der In-vitro-Kurzzeittest erfolgte nach einer von VOLM und Mitarbeitern (1970) angegebenen und von POSSINGER und Mitarbeitern (1976) auf Mikrotiterplatten adaptierten Methodik.

2.2. Material

Zytostatika:

5-Fluor-Uracil (Fluor-Uracil "Roche"^R, La Roche Grenzach),
Adriamycin (Adriblastin^R, Montedison, Freiburg),
Thiotepa (Thiotepa^R, Lederle, München),
Cytosin-Arabinosid (Alexan^R, Mack, Illertissen),
Hydroxyharnstoff (Litalier^R, Serva, Heidelberg),
Nitrogen-Mustard (Mustargen^R, Merck Sharp und Dohme, West
Point, USA).

Radioaktive Substanzen:

³H-Thymidin (spez. Akt. 5 Ci/mM),

³H-Uridin (spez. Akt. 8,4 Ci/mM):

Radiochemical Centre, Amersham, England.

Nährlösung:

TCM 199 (DIFCO Laboratories, Detroit Michigan, USA).

Mikrotiterplatten (M 220-21 ART, BOLL, München),

Eppendorfpipetten,

0,9%ige physiologische Kochsalzlösung,

Glasfilterstreifen (reeve angel, Clifton, New Jersey, USA),
Multiprecipitator-Harvester (OTTO HILLER, Madison, Wisconsin,
USA),

Filtergaze (Art. Nr. 7-200, Schweizerische Seidengazefabrik
AG., Zürich, Schweiz),

TRI-CARB Liquid scintillation Spectrometer (Fa. Packard),
Toluol Szintillationsflüssigkeit (Fa. Roth, München).

Tumormaterial:

L 1210 Leukämiezellen aus eigener Züchtung.

2.3. Methodik

Der L 1210 Langzeitkultur wurden ca. 5 ml Zellsuspension entnommen und auf eine definierte Zellzahl von 500 000 Zellen/ml standardisiert (Zählkammer nach NEUBAUER).

Davon wurden je 50 µl mit einer Eppendorfpipette auf die Mikrotiterplatten übertragen.

Anschließend erfolgte die Zugabe von je 100 µl der Zytostatika Adriamycin (Adriblastin^R), Thiotepa (Thiotepa^R), Cytosin-Arabinosid (Alexan^R), Hydroxyharnstoff (Litalier^R) und Nitrogen-Mustard (Mustargen^R) in 5 verschiedenen Konzentrationsbereichen (Tab. 2).

Die Verwendung der fünf verschiedenen Konzentrationen erfolgte in der Vorstellung, die Differenzen der Präcursoreinbauhemmung deutlicher hervortreten zu lassen.

Um statistische Schwankungen auszugleichen, wurde jeder Testansatz in 12 Einzelproben unterteilt, die jeweils das entsprechende Zytostatikum in gleicher Konzentration erhielten.

Die Testsubstanzen wurden jedesmal frisch angesetzt und auf 37° C vorgewärmt.

Pro Platte erhielten je 12 Testansätze keine Zytostatika und dienten als Kontrolle.

Nach 2stündiger Inkubation im Brutschrank bei 37° C erfolgte die Zugabe von ³H-Thymidin (Fa. Amersham, spez. Akt. 5 Ci/mM) oder ³H-Uridin (Fa. Amersham, spez. Akt. 8,4 Ci/mM) in einer Endkonzentration von 5 µCi/ml (Tab. 3).

Während des gesamten Versuchsablaufs wurde die Lebensfähigkeit der Zellen durch Thymidin- und Uridinkinetik in den Zeiten von 0 - 60 min, 60 - 120 min und 120 - 180 min überprüft.

Bei lebenden Zellen muß der Einbau von Thymidin bzw. Uridin ständig zunehmen bzw. gleichbleiben.

Nach Ablauf von weiteren 60 min wurde die Inkubation durch abruptes Abkühlen auf -20° C gestoppt, um sämtliche Zellfunktionen zum Erlöschen zu bringen.

Nach dem Auftauen wurden die Ansätze mit dem Multiprecipitator-Harvester von den Mikrotiterplatten auf Filtermembranen gesogen und viermal mit physiologischer Kochsalzlösung gespült, um die in den Zellen nicht eingebauten radioaktiven Präkursoren zu extrahieren.

Die Filtermembranstreifen wurden auf einer Trockenbank getrocknet, in die entsprechenden Proben aufgeteilt und mit einer Pinzette in das Szintillationsröhrchen übertragen.

Anschließend wurde jedem Röhrchen 5 ml Toluol-Szintillationsflüssigkeit zugesetzt.

Die Messung erfolgte pro Probe 4 min lang im TRI-CARB Liquid Scintillations Spectrometer (Fa. Packard).

Aus je 12 Einzelwerten eines Testansatzes wurde der Mittelwert ausgerechnet.

Die Einbaurrate der mit Zytostatika behandelten Ansätze wurde auf die unbehandelten Kontrollwerte bezogen, wobei deren Einbau = 100% gesetzt wurde.

Anschließend wurde die Dosiswirkungskurve erstellt (Abb. 2 - 3).

Therapeutische Dosis beim Menschen

	0,01	0,1	1	10	100
Cytostatika	I	II	III	IV	V
Adriamycin	8×10^{-6}	8×10^{-5}	8×10^{-4}	8×10^{-3}	8×10^{-2}
Thiotepa	1×10^{-5}	1×10^{-4}	1×10^{-3}	1×10^{-2}	1×10^{-1}
5-Fluoruracil	$1,5 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^{-1}$	1,5
Cytosin-Arabinosid	2×10^{-5}	2×10^{-4}	2×10^{-3}	2×10^{-2}	2×10^{-1}
Hydroxy-Harnstoff	3×10^{-4}	3×10^{-3}	3×10^{-2}	3×10^{-1}	3
Nitrogen-Mustard	2×10^{-6}	2×10^{-5}	2×10^{-4}	2×10^{-3}	2×10^{-2}

Tab. 2: Testkonzentrationen der verwendeten Cytostatika in mg/ml Nährlösung

Cytostatika	^3H -Thymidin	^3H -Uridin
Adriamycin	+	+
Thiotepa	+	+
5-Fluoruracil		+
Cytosin-Arabinosid	+	
Hydroxy-Harnstoff	+	
Nitrogen-Mustard	+	

Tab. 3: Zuordnung der jeweiligen radioaktiv-markierten Stoffwechselpräkursoren zu den verwendeten Cytostatika

2.4. Ergebnisse

Die Abbildungen 2 - 9 zeigen den Einbau von radioaktiven Nucleinsäurepräkursoren durch L 1210 Leukämiezellen nach 3stündiger Inkubation mit Zytostatika in Prozenten bezogen auf die Kontrollen.

Der Einbau von ^3H -Thymidin bzw. ^3H -Uridin in L 1210 Leukämiezellen unter Einwirkung von Adriamycin wurde deutlich gehemmt (Abb. 2 und 3).

Der Einbau von ^3H -Thymidin bzw. ^3H -Uridin betrug bei einer Konzentration

von 8×10^{-6} mg/ml $32 \pm 8\%$ bzw. $35 \pm 11\%$,

bei 8×10^{-5} mg/ml $36 \pm 7\%$ bzw. $31 \pm 9\%$,

bei 8×10^{-4} mg/ml $23 \pm 3\%$ bzw. $17 \pm 5\%$,

bei 8×10^{-3} mg/ml $18 \pm 7\%$ bzw. $27 \pm 7\%$

und bei der höchsten Konzentration

von 8×10^{-2} mg/ml $6 \pm 4\%$ bzw. $15 \pm 6\%$.

Bei Thiotepa war der Einbau von ^3H -Thymidin bezogen auf die Kontrollzellen bei einer Konzentration

von 1×10^{-5} mg/ml $32 \pm 7\%$,

bei 1×10^{-4} mg/ml $18 \pm 5\%$,

bei 1×10^{-3} mg/ml $20 \pm 5\%$,

bei 1×10^{-2} mg/ml $10 \pm 6\%$

und erreichte bei einer Konzentration

von 1×10^{-1} mg/ml den tiefsten Wert von $8 \pm 6\%$ (Abb. 3).

Eine Einbauhemmung konnte bei Thiotepa auch mit ^3H -Uridin nachgewiesen werden. Diese war jedoch etwas schwächer ausgeprägt als mit ^3H -Thymidin.

Hier betrug der Einbau bei einer Konzentration

von 1×10^{-5} mg/ml $52 \pm 13\%$,

bei 1×10^{-4} mg/ml $22 \pm 3\%$,

bei 1×10^{-3} mg/ml $18 \pm 5\%$,

bei 1×10^{-2} mg/ml $25 \pm 7\%$

und bei 1×10^{-1} mg/ml $22 \pm 7\%$ der Kontrollen (Abb. 5).

Der Einbau von ^3H -Uridin bezogen auf die Kontrollen betrug bei

5-Fluoruracil bei einer Konzentration

von $1,5 \times 10^{-4}$ mg/ml $52 \pm 11\%$,

bei $1,5 \times 10^{-3}$ mg/ml $34 \pm 10\%$,

bei $1,5 \times 10^{-2}$ mg/ml $35 \pm 4\%$,

bei $1,5 \times 10^{-1}$ mg/ml $18 \pm 9\%$

und bei $1,5$ mg/ml $24 \pm 10\%$ (Abb. 6).

Bei mit Cytosin-Arabinosid behandelten L 1210 Leukämiezellen entsprach der Einbau von ^3H -Thymidin bei einer Konzentration

von 2×10^{-5} mg/ml $50 \pm 4\%$,

bei 2×10^{-4} mg/ml $36 \pm 7\%$,

bei 2×10^{-3} mg/ml $21 \pm 3\%$,

bei 2×10^{-2} mg/ml $18 \pm 3\%$

und bei 2×10^{-1} mg/ml $16 \pm 5\%$ (Abb. 7).

Bei Hydroxy-Harnstoff betrug der Einbau von ^3H -Thymidin bei einer Konzentration

von 3×10^{-4} mg/ml $67 \pm 7\%$,

bei 3×10^{-3} mg/ml $38 \pm 4\%$,

bei 3×10^{-2} mg/ml $28 \pm 6\%$,

bei 3×10^{-1} mg/ml $24 \pm 8\%$

und bei der höchsten Konzentration

von 3 mg/ml $21 \pm 7\%$ (Abb. 8).

Der Einbau von ^3H -Thymidin war bei Tumorzellen, die mit Nitrogen-Mustard behandelt worden waren, bei einer Konzentration

von 2×10^{-6} mg/ml $45 \pm 10\%$,

bei 2×10^{-5} mg/ml $33 \pm 4\%$,

bei 2×10^{-4} mg/ml $19 \pm 7\%$,

bei 2×10^{-3} mg/ml $15 \pm 6\%$

und bei 2×10^{-2} mg/ml $21 \pm 8\%$ der Kontrollen (Abb. 9).

2.5. Diskussion

Zieht man das Ausmaß der Hemmung der Nucleinsäuresynthese als ein Kriterium für die Zytostatika-bedingte Beeinflussung des Tumorzellstoffwechsels heran, so ist für die Interpretation der Inkubationsergebnisse die Kenntnis des spezifischen Wirkungsmechanismus der einzelnen Zytostatika notwendig.

Als Zytostatika verwendeten wir 6 in der Klinik zur Behandlung von Tumorkranken bekannte Substanzen.

In Cytosin-Arabinosid und Hydroxyharnstoff haben wir zwei zyklus- und phasenspezifische Medikamente gewählt, die fast ausschließlich die DNA-Synthese hemmen.

Adriamycin und 5-Fluoruracil sind zwar zyklusabhängige aber phasenunspezifische Zytostatika mit Wirkung auf alle bzw. die meisten Zyklusphasen.

Nitrogen-Mustard und Thiotepa zählen zu der Gruppe der alkylierenden Substanzen, und ihre Wirkung auf die Zellen ist weder zyklus- noch phasenspezifisch (BRUCE et al., 1966; MAURO and MADOC-JONES, 1970; RAJEWSKY, 1972).

In den Abbildungen 2 - 9 ist ein Beobachtungszeitraum von jeweils 3 Stunden dargestellt, der bei allen 6 verwendeten Zyto-

statika eine dosisabhängige Einbauhemmung der Nucleinsäurepräkursoren ^3H -Thyminid bzw. ^3H -Uridin unabhängig von ihrem Wirkungsmechanismus sichtbar werden läßt. In unseren In-vitro-Versuchen konnte mit allen Zytostatika eine Einbauhemmung erzielt werden.

Die Zytostatikawirkung war in jedem Falle bei niedriger Konzentration proportional der Medikamentendosis, um dann bei höheren Konzentrationen eine Plateauphase zu erreichen, in der auch bei einer ca. 100fachen therapeutischen Dosis keine Beeinflussung der Nucleinsäuresynthese mehr möglich war.

Das Plateauphänomen könnte bei zyklus- und phasenspezifischen Medikamenten wie Thiotepa und Nitrogen-Mustard durch das Vorhandensein einer resistenten Subpopulation erklärt werden.

Ausdruck des Plateauphänomens bei zyklusabhängigen Zytostatika könnte die Tatsache sein, daß ein Anteil der Tumorzellen während der 3stündigen Beobachtungszeit nicht am Zellzyklus teilnahm bzw. sich in einer Zyklusphase befand, wo die Medikamente nicht wirken konnten.

Aus der Abbildung 2, 3, 4 und 5 ist ersichtlich, daß im Kurzzeittest die Hemmung der Nucleinsäuresynthese durch die Zytostatika Adriamycin und Thiotepa durch ^3H -Thyminid und ^3H -Uridin gleich gut darstellbar waren.

Der verhältnismäßig uniforme Verlauf der Dosiswirkungskurven

könnte aus dem Proliferationsverhalten der L 1210 Leukämiezellen erklärt werden.

Es besteht zwischen der Höhe der Einbauhemmung von radioaktiven Stoffwechselvorläufern und der Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors eine direkte Beziehung.

Danach sprechen bei In-vitro-Versuchen schnell wachsende Tumorp Populationen auf unterschiedliche Chemotherapeutika gleichartig an, d. h. sie reagieren bei den meisten Mitteln mit einer Einbauhemmung wie es auch die hier erhaltenen Dosiswirkungskurven gezeigt haben (BASTERT und Mit., 1975; VOLM und Mit., 1976).

Bedingt durch die sehr kurze Generationszeit und die hohe Wachstumsfraktion der L 1210 Zellpopulation bewirkten die hier verwendeten Zytostatika trotz unterschiedlichem Wirkungsmechanismus eine vergleichbar starke dosisabhängige Einbauhemmung von ^3H -Thymidin bzw. ^3H -Uridin.

Wie die erhaltenen Dosiswirkungskurven zeigen, kann dieser Kurzzeittest reproduzierbar eine quantitative Einbauhemmung von radioaktiven Stoffwechselvorläufern in den Nucleinsäuren anzeigen.

Eine dreistündige Inkubation von Tumorzellen mit Zytostatika muß jedoch kritisch bewertet werden, da eine dosisabhängige

Nucleinsäureeinbauhemmung wenig über eine langfristig wirkende Zellschädigung aussagt.

Der Test erfaßt nur eine Sofortwirkung der chemotherapeutischen Substanzen auf die Tumorzellen, eine Voraussage über das weitere Schicksal der Zellen ist damit nicht möglich, da durch proliferationshemmende Substanzen der Nucleinsäurestoffwechsel so beeinflußt wird, daß eine oder zwei weitere Zellteilungen stattfinden können, bevor die Tochterzellen durch den erlittenen Schaden zugrunde gehen (THOMPSON et al., 1969; WHITMORE et al., 1964).

Um den Verlust der unlimitierten Reproduktionsfähigkeit nachweisen zu können, wäre es deshalb erforderlich, die Tumorzellen wenigstens einen ganzen Generationszyklus oder länger zu beobachten, wie es nur in der Langzeitkultur möglich ist.

Ferner hängt der Zelltod von der Art, dem Ausmaß und der Dauer der Zellschädigung durch die Zytostatika, dem intrazellulären Medikamentenstoffwechsel und der Effizienz des Reparaturmechanismus der behandelten Zellen oder deren Tochterzellen ab. Diese Parameter sind jedoch bei jedem Tumor bzw. bei jedem Zytostatikum an der erfolgten Nucleinsäuresynthesehemmung unterschiedlich stark beteiligt und können meist nicht innerhalb von 3 Stunden ausreichend erfaßt werden.

Der Reparationsmechanismus der Zellen, welcher die durch die

Zytostatika hervorgerufenen Schäden an den Nucleinsäuren wieder ausgleicht, dürfte eine nicht unerhebliche Rolle spielen (MATTHIAS und RIECHE, 1974; BASTERT et al., 1975; SEEGER et al., 1977).

Dieser Vorgang kann durchaus innerhalb von 3 Stunden so effektiv sein, daß es zu einer Verfälschung der tatsächlich stattgefundenen Hemmung der Nucleinsäuresynthese kommen kann.

Es ist ferner schwierig, aus einem bestimmten Verlauf einer Dosiswirkungskurve auf eine in-vivo zu erwartende Sensibilität zu schließen, weil der jeweilige Sensibilitäts- bzw. Resistenzbereich bei jedem Tumor und für jedes Chemotherapeutikum verschieden sein kann.

Es ist deshalb willkürlich, einen fest definierten Grenzbereich festzusetzen, ab wann der Tumor in-vivo als sensibel zu gelten hat.

Die Vorhersage auf die In-vivo-Wirksamkeit der Zytostatika muß kritisch beurteilt werden. Tumoren, die im Test auf zytostatische Substanzen mit Präcursoreinbauhemmung reagiert haben, müssen keinesfalls auch in-vivo darauf ansprechen, da im Organismus eine Wirksamkeit antineoplastischer Substanzen von einer größeren Zahl biologischer Einzelkomponenten abhängt, die natürlich im In-vitro-Test unberücksichtigt bleiben

müssen: Anreicherung von Zytostatika an bestimmten Organen, Verteilungs-, Ausscheidungs- und Aktivierungsvorgänge, Vaskularisierung des Tumorstromas, immunologische Abwehr des Organismus und schwankende Proliferationsaktivitäten der Tumorzellen.

Aus diesen Gründen hat der In-vitro-Test keine Aussagekraft über die Sensibilität des Tumors gegenüber bestimmten Zytostatika.

Wenn aber im Test der Einbau von Nucleinsäurepräkursoren mit Zytostatika sich kaum von denen der Kontrollzellen unterscheidet, dann kann davon ausgegangen werden, daß in-vivo auch keine Tumorbeflussung zu erwarten sein wird.

Diese Aussage ist deswegen wichtig, weil im Test sowohl für die Tumorzellen als auch für das einwirkende Zytostatikum unphysiologische Idealbedingungen wie gleichbleibende Konzentration des Zytostatikums während der gesamten Versuchsdauer, extrem hohe Medikamentenkonzentrationen und enger Kontakt zwischen den suspendierten Zellen und den Substanzen herrschen.

Bedingt durch die verhältnismäßig kurze Inkubationszeit wird diese Aussage bei sehr langsam proliferierenden Malignomen eingeschränkt. Diese Zellen nehmen in der gleichen Zeit sehr wenig radioaktiv markierte Stoffwechselpräkursoren auf und

täuschen eine zellulär bedingte Resistenz vor.

Trotz der genannten Einschränkungen stellt der Kurzzeittest ein wichtiges Hilfsmittel bei der Auswahl von Zytostatika dar: Eine Kurzzeitinkubation von Tumorzellen in Gegenwart von Zytostatika unter Zusatz von radioaktiv-markierten Stoffwechselpräkursoren ermöglicht die grundsätzliche Aussage, daß das untersuchte Tumormaterial gegenüber den klinisch verwendeten Zytostatika resistent bzw. nicht resistent sein kann.

Vorliegender Test kann so bei der Feststellung einer Tumoresistenz bzw. einer Resistenzentstehung gegenüber einem Medikament eine wichtige Rolle spielen.

Der Ausschluß therapieresistenter Fälle durch den Kurzzeittest ist außerordentlich wichtig, weil primäre oder sekundäre chemotherapieresistente Tumoren in der Klinik einer der Hauptgründe für das Fehlschlagen einer chemotherapeutischen Tumorbehandlung sind.

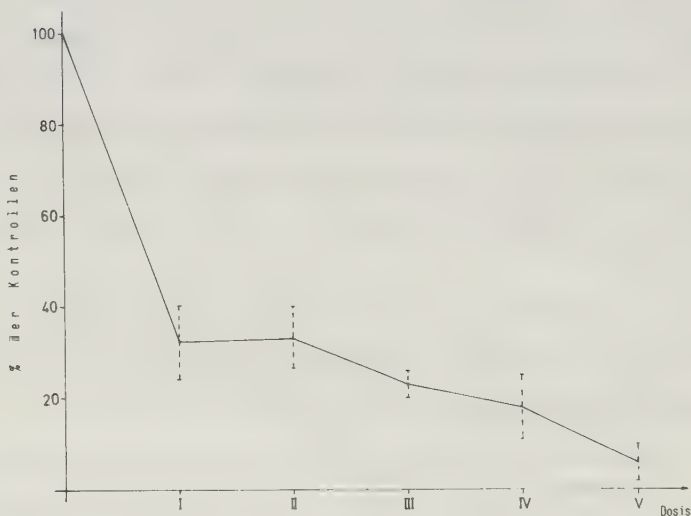


Abb. 2: Dosisabhängige Wirkung von Adriamycin auf die Nucleinsäuresynthese der L 1210 Mause-Leukämiezellen
 Markierung mit H³-Thymidin
 gestrichelte Vertikale: Standardabweichung der Mittelwerte
 Abszisse: Dosierung der Cytostatika I - V (Tab. 2)

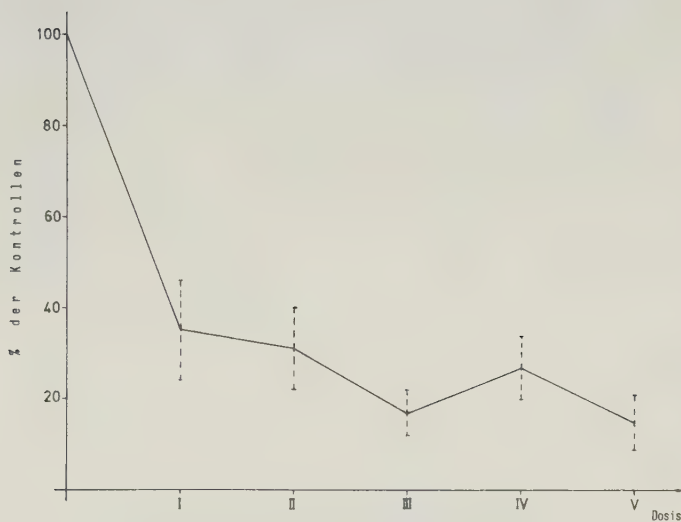


Abb. 3: Dosisabhängige Wirkung von Adriamycin auf die Nucleinsäuresynthese der L 1210 Mäuse-Leukämiezellen
 Markierung mit H³-Uridin
 gestrichelte Vertikale: Standardabweichung der Mittelwerte
 Abszisse: Dosierung der Cytostatika I - V (Tab. 2)

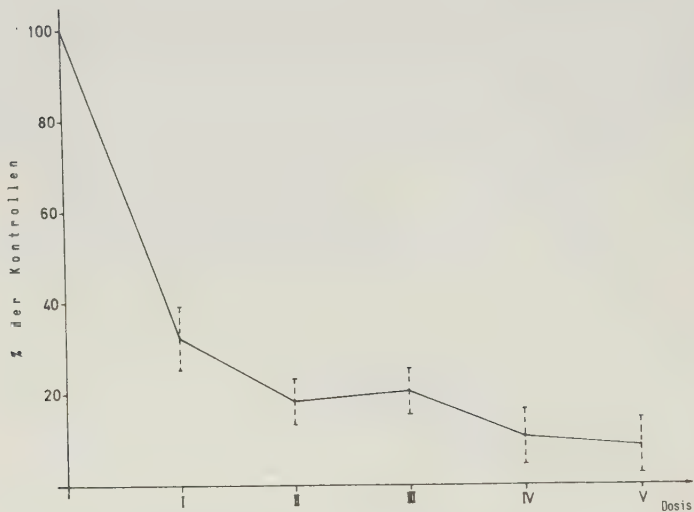


Abb. 4: Dosisabhängige Wirkung von Thiotepe auf die Nucleinsäuresynthese der L 1210 Mäuse-Leukämiezellen
 Markierung mit ^3H -Thymidin
 gestrichelte Vertikale: Standardabweichung der Mittelwerte
 Abszisse: Dosierung der Cytostatika I - V (Tab. 2)

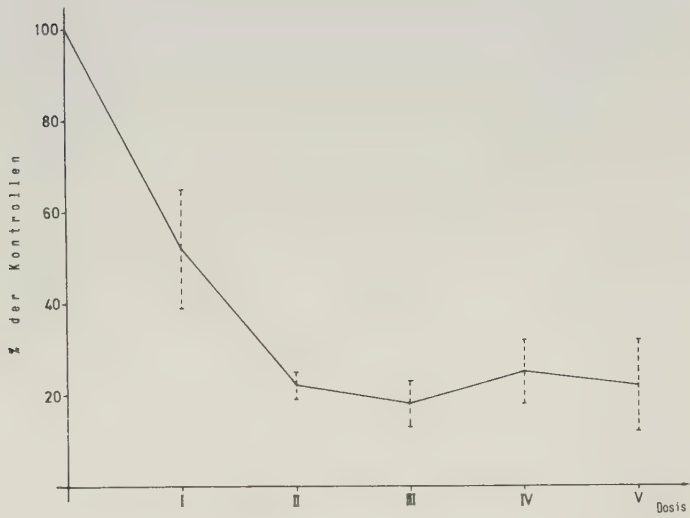


Abb. 5: Dosisabhängige Wirkung von Thiotepa auf die Nucleinsäuresynthese der L 1210 Mäuse-Leukämiezellen
 Markierung mit H³-Uridin
 gestrichelte Vertikale: Standardabweichung der Mittelwerte
 Abszisse: Dosierung der Cytostatika I - V (Tab. 2)

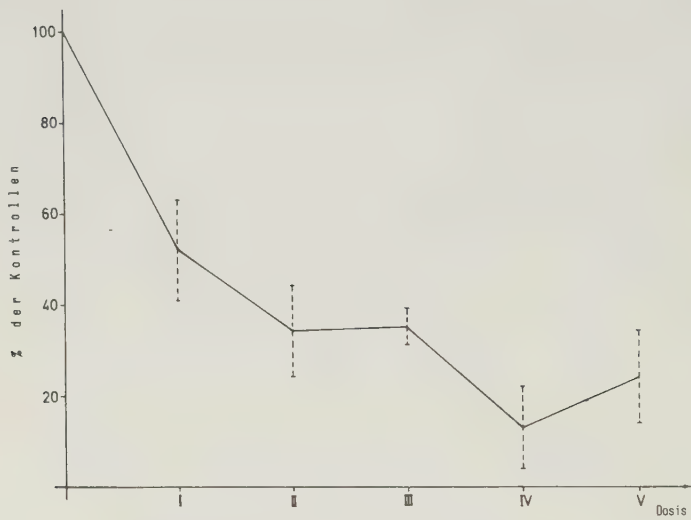


Abb. 6: Dosisabhängige Wirkung von 5-Fluoruracil auf die Nucleinsäuresynthese der L 1210 Mause-Leukämiezellen

Markierung mit ^3H -Uridin

gestrichelte Vertikale: Standardabweichung der Mittelwerte

Abzisse: Dosierung der Cytostatika I - V (Tab. 2)

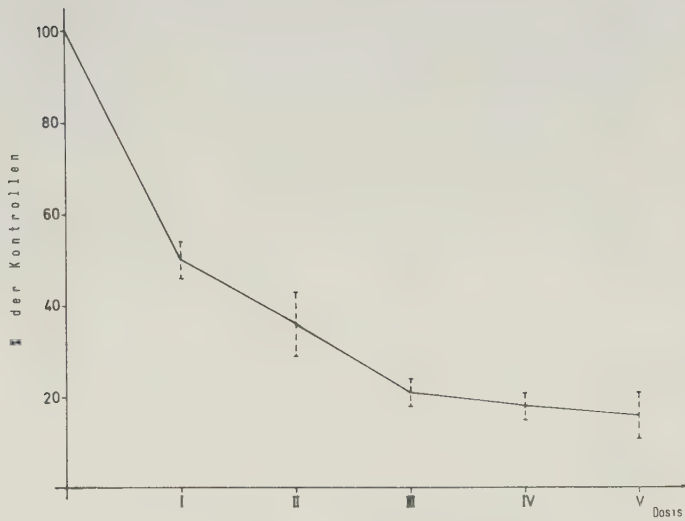


Abb. 7: Dosisabhängige Wirkung von Cytosin-Arabinosid auf die Nucleinsäuresynthese der L 1210 Mäuse-Leukämiezellen
 Markierung mit H³-Thymidin
 gestrichelte Vertikale: Standardabweichung der Mittelwerte
 Abszisse: Dosierung der Cytostatika I - V (Tab. 2)

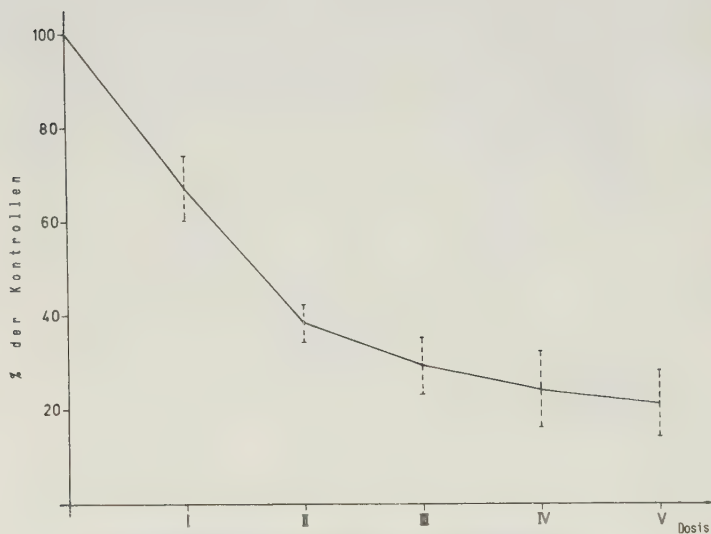


Abb. 8: Dosisabhängige Wirkung von Hydroxy-Harnstoff auf die Nucleinsäuresynthese der L 1210 Mäuse-Leukämiezellen

Markierung mit H³-Thymidin

gestrichelte Vertikale: Standardabweichung der Mittelwerte

Abzisse: Dosierung der Cytostatika I - V (Tab. 2)

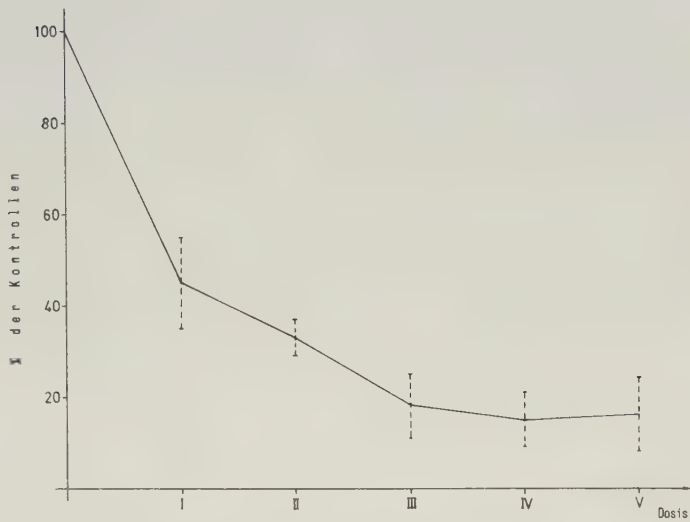


Abb. 9: Dosisabhängige Wirkung von Nitrogen-Mustard auf die Nucleinsäuresynthese der L 1210 Mause-Leukämiezellen
 Markierung mit H³-Thymidin
 gestrichelte Vertikale: Standardabweichung der Mittelwerte
 Abszisse: Dosierung der Cytostatika I - V (Tab. 2)

3. BESTIMMUNG DER ZYTOSTATISCHEN WIRKUNG VON MEDIKAMENTEN AUF

L 1210 MÄUSE-LEUKÄMIEZELLEN MIT HILFE DER γ -RELEASESTECHNIK

3.1. Einleitung

Die Freisetzung von incorporierten, radioaktiven Markierungssubstanzen aus geschädigten Zellen wird häufig als Parameter einer Zytolyse benutzt.

Neben Nucleinsäurevorläufersubstanzen wie ^{14}C -Thyminidin (VAINO et al., 1964; HOLM et al., 1964), ^3H -Uridin (HASHIMOTO und SUDO, 1971) und ^{125}J -5-iodo-2-deoxyuridin (COHEN et al., 1971) wird vor allem ^{51}Cr als Markierungssubstanz verwendet (SANDERSON, 1964; BRUNNER et al., 1968; HENNEY, 1973).

In jüngster Zeit wird radioaktives Chrom als Indikator einer zellvermittelten Zytotoxizität mittels der γ -Releasetechnik in verschiedenen Bereichen der Immunologie eingesetzt (SANDERSON, 1964; BRUNNER und Mit., 1966; BRUNNER und Mit., 1968; FASS und FEFFER, 1972; MENARD et al., 1972).

Wir wandten diese Methode an, um festzustellen, ob durch verschiedene Zytostatikakonzentrationen zytotoxische Effekte auf

Tumorzellen nachgewiesen werden können.

Als Tumormaterial benutzten wir L 1210 Leukämiezellen aus eigener Zucht.

Es kamen wiederum die gleichen Zytostatika in 5 verschiedenen Konzentrationsbereichen wie im letzten Versuch zur Anwendung.

3.2. Methodik

Der L 1210 Langzeitkultur wurden 10 ml Zellsuspendat entnommen, auf 10 Mill. Zellen/ml eingestellt und bei 800 U/min 5 min lang zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment mit 500 μCi ^{51}Cr (NEN, Dreieich; spez. Akt. 10 - 35 $\mu\text{Ci/ml}$) über 90 min bei 37° im Wasserbad inkubiert.

Um das von den Zellen nicht incorporierte Chrom zu extrahieren, wurde das Zellkonzentrat auf Eis dreimal mit phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung unter Zusatz von 10%igem fötalen Kälberserum gewaschen, in 37° warmer Nährlösung (TCM 199 DIFCO Laboratories Detroit, Michigan, USA) resuspendiert und auf eine Zellzahl von 200 000 Zellen/ml (Zählkammer nach NEUBAUER) eingestellt.

Je 50 μl ($= 10^4$ Zellen/ml) der Zellsuspension und 100 μl der jeweiligen Zytostatikakonzentration wurden dann mit einer Pipette (EPPENDORF) auf eine Mikrotiterplatte übertragen.

Jede Ansatzlösung war in 5 Einzelproben unterteilt, um statistische Schwankungen auszugleichen.

10 Testansätze erhielten keine Medikamente, sie dienten zur Ermittlung des Spontanrelease.

10 Testansätze erhielten statt Zytostatika 100 µl Zaponin (1:10 verdünnt, Fa. Coulter Electronico Ltd.), das zu einer Zytolyse führte.

Diese Testansätze dienten zur Ermittlung des Maximalrelease. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37° C für 2, 3 und 5 Stunden.

Danach wurden die Mikrotiterplatten im Plattenzentrifugator (Hettich Rotomang K4) bei 1200 U/min 5 min lang zentrifugiert.

Mit einer auf Mikrotiterplatten adaptierten automatischen Spritze der Fa. Hamilton wurde dann der zellfreie Überstand vorsichtig entnommen, in serological tubes (Fa. Nane, Dänemark) übertragen, dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung nachgespült und dessen Radioaktivität im GAMMA-Liquidszintillationszähler Nr. 53047 der Fa. Packard je 5 min lang gemessen.

Aus je 5 Einzelwerten eines Testansatzes wurde dann der Mittelwert errechnet und die Ergebnisse graphisch dargestellt (Abb. 10 - 15).

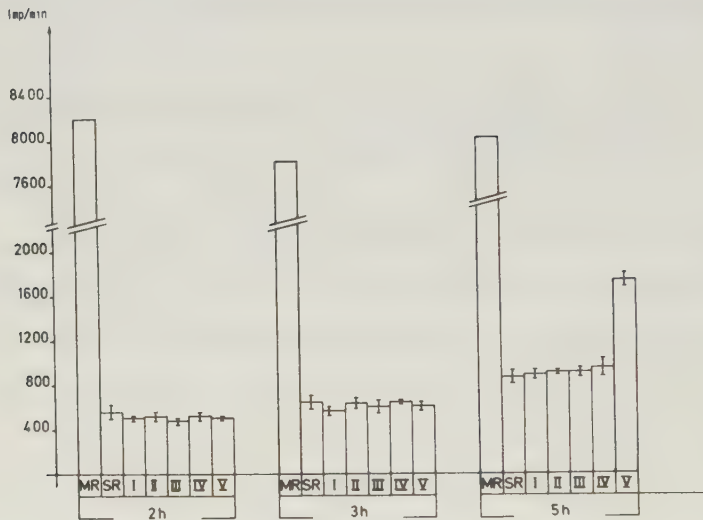


Abb. 10: Cytotoxischer Effekt von Adriamycin auf L 1210 Mäuse-Leukämiezellen
 ermittelt mit Hilfe der γ -Release-Technik
 Abszisse: Dosierung der Cytostatika I - V (Tab. 2)
 MR = Maximalrelease
 SR = Spontanrelease

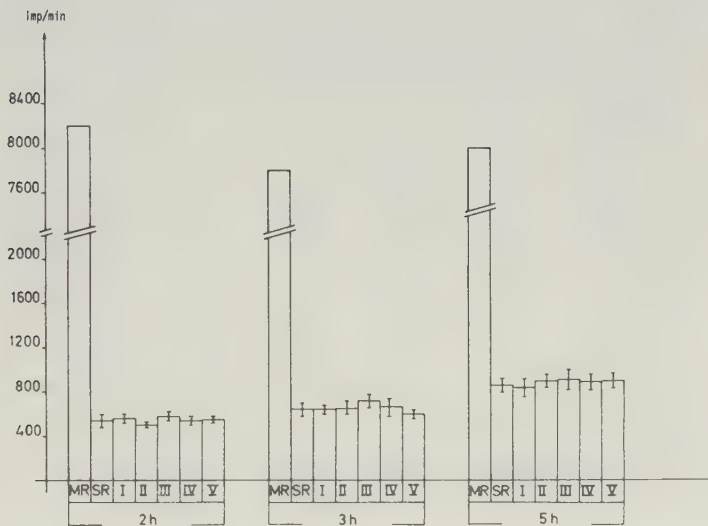


Abb. 11: Cytotoxischer Effekt von Thiotepa auf L 1210 Mäuse-Leukämiezellen
ermittelt mit Hilfe der γ -Releasetechnik
Abszisse: Dosierung der Cytostatika I - V (Tab. 2)
MR = Maximalrelease
SR = Spontanrelease

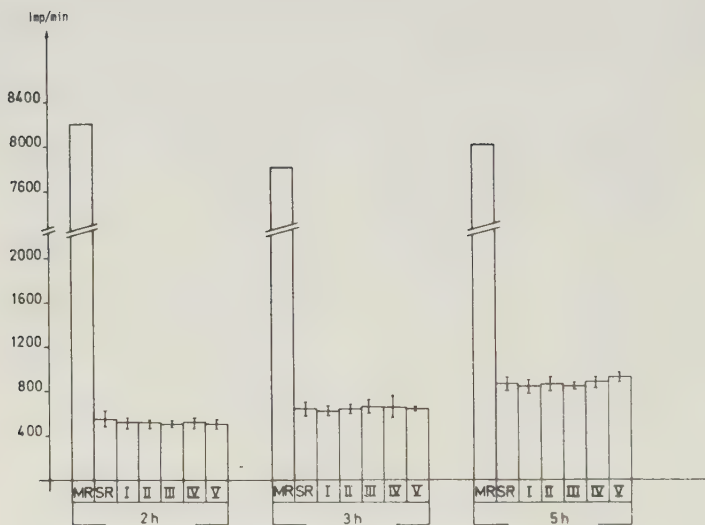


Abb. 12: Cytotoxischer Effekt von 5-Fluoruracil auf L 1210 Mäuse-Leukämiezellen
ermittelt mit Hilfe der γ -Releasetechnik

Abszisse: Dosierung der Cytostatika I - V (Tab 2)

MR = Maximalrelease

SR = Spontanrelease



Abb. 13: Cytotoxischer Effekt von Cytosin-Arabinosid auf L 1210 Mause Leukämiezellen
 ermittelt mit Hilfe der γ -Release-Technik
 Abszisse: Dosierung der Cytostatika I - V (Tab. 2)
 MR - Maximalrelease
 SR - Spontanrelease

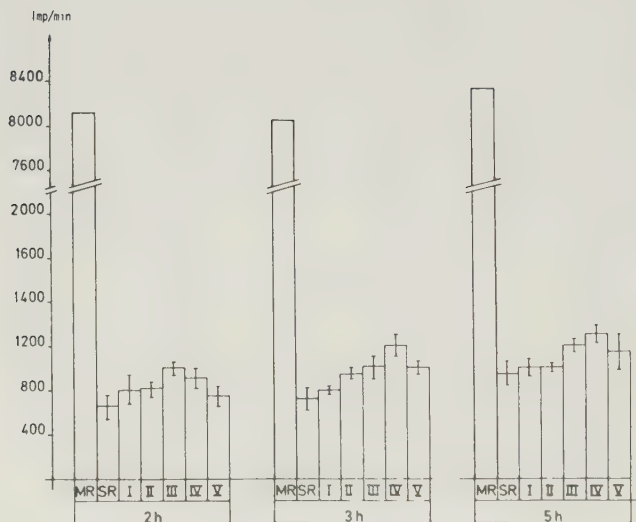


Abb. 14: Cytotoxischer Effekt von Hydroxy-Harnstoff auf L 1210 Mause-Leukamiezellen
ermittelt mit Hilfe der γ -Release-Technik

Abzisse: Dosierung der Cytostatika I - V (Tab. 2)

MR = Maximalrelease

SR = Spontanrelease

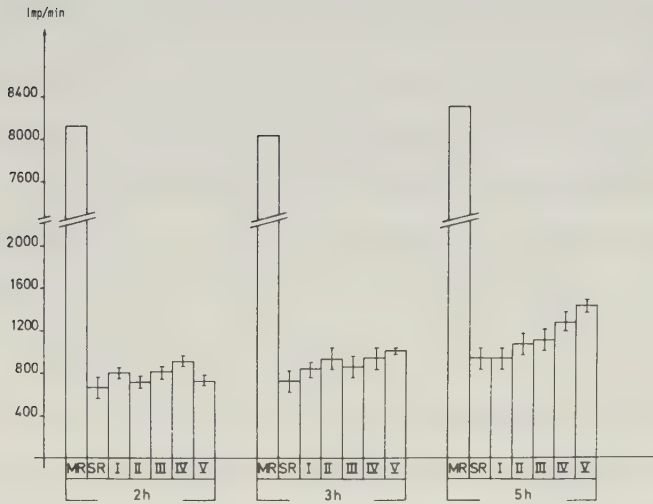


Abb. 15: Cytotoxischer Effekt von Nitrogen-Mustard auf L 1210 Mause-Leukämiezellen
ermittelt mit Hilfe der γ -Releasetechnik
Abszisse: Dosierung der Cytostatika I - V (Tab. 2)
MR = Maximalrelease
SR = Spontanrelease

3.3. Material

Zytostatika: siehe 2.2.

Nährlösung: TCM 199 (DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA)

Radioaktive Substanz: $^{51}\text{Chrom}$ spez. Akt. 10 - 35 mCi/ml (NEN, Dreieich)

Mikrotiterplatten M 220-21 ART (BOLL, München)

Eppendorfpipetten

Zaponin (1:10 verdünnt der Fa. Coulter Electronico Ltd.)

Plattenzentrifuge (Hettich Rotomang K4)

Hamilton-Spritze (auf Mikrotiterplatten adaptiert)

Serological tubes (NUNE, Dänemark)

0,9% physiologische Kochsalzlösung

Auto-Gamma Scintillation Spectrometer (Packard)

Tumormaterial: L 1210 Leukämiezellen aus eigener Züchtung

3.4. Ergebnisse

Im beobachteten Zeitraum war bei den nicht mit Zytostatika behandelten L 1210 Leukämiezellen ein spontaner Chrom⁵¹ Release vorhanden, der zeitabhängig von 6,6% (547 Impulse/min) in der 2. Stunde auf 8,1% (638 Impulse/min) in der 3. Stunde, und schließlich auf 10,7% (857 Impulse/min) des Maximalreleases in der 5. Stunde anstieg.

Der Maximalrelease lag bei 7792 Impulse/min und 8235 Impulse/min und zeigte keine Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Bei den Tumorzellen, die mit Thiotepa, 5-Fluoruracil, Cytosin-Arabinosid oder Hydroxyharnstoff behandelt worden waren, stieg die Impulsmenge ebenfalls zeitabhängig von durchschnittlich 538 ± 35 Impulse/min in der 2. Std. auf 647 ± 42 Impulse/min in der 3. Stunde und 870 ± 48 Impulse/min in der 5. Stunde an. Diese Werte entsprachen jeweils dem Spontanrelease der Kontrollansätze.

Wie aus den Graphiken ersichtlich ist, war bei den 4 Zytostatika weder ein zeit- noch ein dosisabhängiger medikamentenspezifischer Effekt auf die Tumorzellen vorhanden.

Während die Impulsmengen in den ersten 3 Stunden in allen gemessenen Konzentrationsbereichen denen der Kontrollansätze ent-

sprachen, fand sich unter der höchsten Adriamycinkonzentration von 8×10^{-2} mg/ml in der 5. Stunde ein sprunghafter Anstieg der Impulszahl von 935 ± 80 Impulse/min auf 1714 ± 60 Impulse/min.

Das Medikament Nitrogen-Mustard bewirkte in den ersten 3 Stunden ebenfalls keinen Anstieg des radioaktiven Chrms der Überstandsflüssigkeit.

In der 5. Stunde jedoch war eine gewisse Dosisabhängigkeit der freigesetzten Radioaktivität.

Die Impulsmenge stieg ständig von 948 ± 100 Impulse/min bei einer Konzentration von 2×10^{-6} mg/ml Mustargen auf 1462 ± 54 Impulse/min bei der höchsten angewandten Konzentration von 2×10^{-2} mg/ml.

3.5. Diskussion

Die unterschiedlich konzentrierten Zytostatika bewirkten nach dreistündiger Inkubation mit L 1210 Leukämiezellen keine zytotoxische Veränderungen (Abb. 10 - 15).

Thiotepa, 5-Fluoruracil, Cytosin-Arabinosid und Hydroxyharnstoff wirkten auch nach 5 Stunden nicht zytotoxisch, während die mit Adriamycin und Nitrogen-Mustard inkubierten Zellen nach 5 Stunden eine Zytolyse erkennen lassen.

Der Grund dafür könnte sein, daß die verwendeten Zytostatika vorwiegend zu einer Änderung des Zellmetabolismus und hier vor allem zu einer Hemmung der Nucleinsäuresynthese führen.

Voraussetzung für das Freiwerden von in Zellen incorporiertem Chrom ist jedoch nach RONAI (1969) und HENNEY (1973) eine beträchtliche Änderung der Zellmembranpermeabilität, da radioaktives Chrom unspezifisch an intrazelluläres Protein gebunden und erst nach einer Zytolyse wieder freigesetzt wird (SANDERSON, 1964; BRUNNER, 1968; RONAI, 1969).

Aus den erhaltenen Ergebnissen kann gefolgert werden, daß die Vitalität der Tumorzellen während der ersten 3 Stunden erhalten bleibt und die eingesetzten Zytostatikakonzentrationen innerhalb dieser Zeit zu keiner Zytolyse führen.

Die Hemmung des Zellmetabolismus durch diese Medikamente führte mit Ausnahme von Adriamycin und Nitrogen-Mustard auch nach fünfstündiger Inkubation zu keiner größeren direkten oder indirekten Schädigung der Zellmembran und somit zu keiner erhöhten Chromfreisetzung.

ZUSAMMENFASSUNG

Um zu einer besseren Beurteilung der In-vitro-Resistenztestung zu gelangen, ist es notwendig, die Proliferationsparameter des verwendeten Tumormaterials zu kennen, da bei dieser Testung zytostatikabedingte Zellstoffwechselstörungen an schnell proliferierenden Tumorzellen gemessen werden. Als Testtumor wurden L 1210-Mäuseleukämiezellen herangezogen.

Die Dauer des Generationszyklus t_C und seiner Teilphasen (t_S , $t_{G_2}+t_M$, t_{G_2}) wurde durch autoradiographische Versuche mit 3H -Thymidin nach der von QUASTLER und SHERMAN angegebenen "Methode der markierten Mitosen" ermittelt.

Die mittlere Generationszeit dauerte 15 Stunden, die S-Phase 8,8 Stunden, die (G_2+M)-Phase 3,9 Stunden und die minimale Phase der G_2 -Phase 0,8 Stunden.

Der Thymidinmarkierungsindex (T.M.I.) betrug 52% und die berechnete potentielle Verdoppelungszeit t_D 13,5 Stunden. Bei dieser L 1210 Zellpopulation handelt es sich um eine schnell wachsende Zellkultur, die als geeignetes Tumormodell diente, die Validität eines In-vitro-Vorhersagetests zu prüfen und die und die zytotoxische Wirkung der in-vitro eingesetzten Substanzen auf die Tumorzellen mittels der γ -Releasetechnik zu erfassen.

Die Beeinflussbarkeit des DNS- bzw. RNS-Stoffwechsels von L 1210 Leukämiezellen wurde durch verschiedene Zytostatika im In-vitro-Test mittels radioaktiv markierter Stoffwechselpräkursoren bestimmt. Es konnte reproduzierbar innerhalb von 3 Stunden eine dosisabhängige Wirkung von Adriamycin, Thiotepa, 5-Fluoruracil, Cytosin-Arabinosid, Hydroxyharnstoff und Nitrogen-Mustard auf den Einbau von ^3H -Thymidin bzw. ^3H -Uridin in die DNS bzw. RNS der Tumorzellen nachgewiesen werden. Während der vorliegende In-vitro-Test keine Aussage über die Sensibilität von Tumorzellen in-vivo zulässt - im Test herrschen sowohl für die isoliert suspendierten Tumorzellen als auch für die verwendeten Zytostatika unphysiologische Bedingungen - kann doch eine fehlende Beeinflussung des Tumorzellstoffwechsels auf eine Zytostatika-Resistenz schließen lassen.

Mit Hilfe der γ -Releasetechnik wurde ein zytotoxischer Effekt der gleichen Zytostatika auf die L 1210-Mäuseleukämiezellen auszuschließen versucht.

Während der ersten 3 Stunden konnte bei keinem Medikament eine Zytolyse nachgewiesen werden.

Daraus kann geschlossen werden, daß während der gesamten Dauer der In-vitro-Resistenztestung die Vitalität der L 1210-Leukämiezellen erhalten bleibt und die unterschiedlich konzentrierten Zytostatika, die in diesem Test eingesetzt werden, nicht unmittelbar zytotoxisch wirken.

LITERATURVERZEICHNIS

1. BASERGA, R.: The relationship of the cell cycle to tumor growth and control of cell division: a review.
Cancer Res. 25, 581 (1965)
2. BASTERT, G., SCHMIDT-MATHIESEN, H., GERNER, R., MICHEL, R. T., NORD, D. und LEPPHEN, G.: In-vitro-Testung der Sensibilität von Mammakarzinomen gegen Zytostatika.
Kurzzeitinkubation von Originaltumorzellen und ^3H -Uridin-Einbaubestimmung.
Dtsch. med. Wschr. 100, 2035 (1975)
3. BLAKEMORE, W. S., MC KENNA, J. M., MC ALLISTER, R. M. and CORIELL, L. L.: The cytotoxic metabolic inhibition test for screening compounds for anti-tumor activity.
Proc. Am. Ass. Cancer Res. 3, 96 (1960)
4. BICKIS, I. J. and HENDERSON, I. W. D.: Biochemical studies of human tumors. - I. Estimation of tumor malignancy from metabolic measurements in vitro.
Cancer 19, 89 (1966)

5. BRUCE, W. R., MEEKER, B. E. and VALERIOTE, F. A.:
Comparison of the sensitivity of normal hematopoietic and transplanted lymphoma colony-forming cells to chemotherapeutic agents administered in vivo.
J. natl. Cancer Inst. 37, 233 (1966)
6. BRUNNER, K. T., MAUEL, J. and SHINDLER, R.: In-vitro studies of cell-bound immunity; cloning assay of the cytotoxic action of sensitized lymphoid cells on allogenic target cells.
Immunology 11, 499 (1966)
7. BRUNNER, K. T., MAUEL, J., CEROTTINI, J. C. and CHAPUIS, B.:
Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ^{51}Cr -labelled allogenic cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs.
Immunology 14, 181 (1968)
8. COBB, J. P., WALKER, D. G. and WRIGHT, J. C.: Comparative chemotherapy studies on primary short-term cultures of human normal, benign and malignant tumor tissues - a 5 year study.
Cancer Res. 21, 583-590 (1961)
9. COHEN, A., MILLAR, R. and KETCHAM, A.: A microassay for cytotoxic antibody using ^{125}J -Jodo-deoxy-uridine-labeled target cells.
Transplantation 13, 57 (1971)

10. DE VITA, C. T.: Cell kinetics and the chemotherapy of cancer.
Cancer chemoth. Rep. 2, 23 (1971)
11. DI PAOLO, J. A.: In vitro test systems for cancer chemotherapy. I. Inhibition of dehydrogenases and growth in the Ehrlich ascites tumor.
Cancer Res. 23, 184 (1963)
12. EAGLE, H., FOLEY, G. E.: The cytotoxic activity of carcinolytic agents in tissue culture.
Am. J. Med. 21, 739-749 (1956)
13. EAGLE, H.: Cytotoxicity in human cell cultures as a primary screen for the detection of antitumor agents.
Cancer Res. 18, 1017-1025 (1958)
14. EHRHART, H.: Chemotherapie maligner Geschwülste.
Münch. med. Wschr. 18, 814 (1973)
15. FASS, L. and FEFER, A.: The application of an in-vitro-cytotoxicity test to studies of the effects of drugs on the cellular immune response in mice. I. Primary response.
J. Immunol. 109, 749 (1972)
16. GILBERT, C. W.: The labelled mitoses curve and the estimation of the parameters of the cell cycle.
Cell Tissue Kinet. 5, 53 (1972)

17. GRADY, J. E., LUMMIS, W. L. and SMITH, C. G.: An improved tissue culture assay. III. Alternate methods for measuring cell growth.
Cancer Res. 3, 1114 (1960)
18. HASHIMOTO, Y. and SUDO, H.: Evaluation of cell damage in immune reactions by release of radioactivity from ^3H -uridine labelled cells.
Gann 62, 139 (1971)
19. HEMPEL, K.: Analyse des Zellzyklus der Melanocyten des Harding-Passey-Melanoms der Maus unter besonderer Berücksichtigung der "Growth-Fraction".
Virchows Arch. Abt. B, Zellpath. 1, 15-30 (1968)
20. HENNEY, C.: Studies on the mechanism of lymphocytemediated cytolysis.
J. Immunology 110, 73 (1973)
21. HOLM, C.; PERLMANN, P. and WERNER, B.: Phytohämagglutinin-induced cytotoxic action of normal lymphoid cells on cells in tissue culture.
Nature 203, 841 (1964)
22. HOWARD, A. and PELC, S. R.: Nuclear incorporation of P-32 as demonstrated by autoradiographs.
Exptl. Cell Res. 2, 178 (1951)

23. KAUFMANN, M., VOLM, M. und GOERTTLER, K.: Sensibilitäts-
testung maligner menschlicher Tumoren gegen-
über Cytostatika.
Klin. Wschr. 49, 219 (1971)
24. KUMMER, D.: Cytostatika- und Röntgenstrahleneffekte im
Nukleinsäurestoffwechsel von soliden malignen
Tumoren in vitro.
Z. Krebsforsch. 74, 76 (1970)
25. KUMMER, D.: Cytostatika-Sensibilitätstest solider, maligner
Tumoren in vitro zur gezielten kombinierten
operativen und chemotherapeutischen Behandlung
des Krebsleidens.
Z. Krebsforsch. 76, 124 (1971)
26. LIMBURG, H. und KRAHE, M.: Die Züchtung von menschlichem
Krebsgewebe in der Gewebekultur und seine Sensi-
bilitätstestung gegen neuere Zytostatika.
Dtsch. med. Wschr. 89, 1938-1946 (1964)
27. MATTHIAS, M. und RIECHE, K.: Chemotherapie maligner Neu-
bildung.
Das deutsche Gesundheitswesen 18, 817 (1974)
28. MAURO, R. and MADOC-JONES, H.: Age responses of cultured
mammatian cells to cytotoxic drugs.
Cancer Res. 30, 1397 (1970)

29. MC ALLISTER, R. M., GRÜNMEIER, P. W., CORIELL, L. L. and BLAKEMORE, W. S.: A quantitative technique for the measurement of in vitro cytotoxicity of 5-fluor-2-deoxyuridine (FUDR), nitrogen mustard (NH₂), and other antitumor agents.
Cancer 12, 938-943 (1959)
30. MENARD, S., PIEROTTI, M. and COLNAGHI, M. J.: ⁵¹Cr micor-test for cellular immunity.
Transplantation 14, 155 (1972)
31. MIYAMURA, S. A.: Determination method for anti-cancer action of antibiotics by the agar plate diffusion technique.
Antibiotics and Chemotherapy 6, 280 (1956)
32. MORASCA, L. et LEONARDI, A.: Méthode rapide pour l'évaluation quantitative de l'activité cytotoxique en culture de tissus par une numération électronique des cellules.
Rev. Franc. Etudes Clin. biol. 10, 759 (1965)
33. MORASCA, L. and BALCONI, G.: Different sensitivity to Actinomycin D of biopsies of human tumors cultivated in vitro.
Europ. J. Cancer 9, 301 (1973)
34. POSSINGER, K., HARTENSTEIN, R. und EHRHART, H.: Resistenztestung von menschlichen Tumoren gegenüber Zytostatika.
Klin. Wschr. 54, 349 (1976)

35. QUASTLER, H. and SHERMAN, F. G.: Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse.
Exp. Cell Res. 17, 420-438 (1959)
36. RABES, H. und JANTSCH, B.: Kombination von Kurzinkubation und Langzeitkultur beim Cytostatika-Test menschlicher Tumorzellen.
Z. Krebsforsch. 74, 295 (1970)
37. RAJEWSKY, M. F.: Zellproliferation in malignen und benignen Geweben: ^3H -Thymidineinbau in vitro unter Standardbedingungen.
Biophysik 3, 65 (1966)
38. RAJEWSKY, M. F., GRÜNEISEN, A. and REMMER, I.: Modification of proliferative parameters by temporary inhibition of DNA synthesis.
Intern. Symposium on Active Control of Nucleic Acid Metabolism, Reinhardtsbrunn, Studia Biophysica (1972)
39. RONAI, P. M.: The elution of ^{51}Cr labelled leucocytes.
A new theory.
Blood 39, 408 (1969)
40. SANDERSON, A. R.: Applications of iso-immune cytotoxicity using radiolabelled target cells.
Nature 204, 250 (1964)

41. SCHULTZE, B.: Die Orthologie und Pathologie des Nukleinsäure- und Eiweißstoffwechsels der Zelle im Autoradiogramm.
Handbuch der allgemeinen Pathologie II, 466-670 (1968)
42. SEEBER, S. und SCHMIDT, C. G.: Zum Problem der prätherapeutischen Sensibilitätsbestimmung von Tumoren durch Inkorporationsstudien in vitro.
Klin. Wschr. 55, 1127 (1977)
43. SEIDEL, H. J. und WEGNER, L. A.: Zur Sensibilitätsbestimmung von Tumoren in vitro. I. Vergleichende Untersuchungen am Jensen-Sarkom in vivo und nach einstündiger Inkubation in vitro.
Z. Krebsforsch. 72, 105-118 (1969)
44. SEIDEL, H. J.: Zur Sensibilitätsbestimmung von Tumoren in vitro. II. Testungen am soliden Ehrlich-Carcinom der Maus und an einem menschlichen Colon-Carcinom nach Heterotransplantation (GW 77).
Z. Krebsforsch. 74, 131-140 (1970)
45. SKIPPER, H. E.: Kinetic behavior versus response to chemotherapy.
in: Prediction of response in cancer therapy.
Nat. Cancer Inst. Monograph. 34 (1971)

46. STEEL, G. G.: The cell cycle in tumors: An examination of data gained by the technique of labelled mitoses.
Cell Tissue Kinet. 5, 87 (1972)
47. TANNENBERGER, S.: Gewebekultur und Krebschemotherapie.
Arch. Geschwulstforsch. 31, 387-400 (1968)
48. TANNENBERGER, S., RIECHE, K., BUTSCHAK, G., GÖRLICH, M.,
MAGDON, E., SCHREMMER, C., HEISE, E. und
BECKER, D.: Über die biologische Individualität
menschlicher Tumoren.
Arch. Geschwulstforsch. 41, 177 (1973)
49. THOMPSON, L. H. and SUIT, H. D.: Proliferation kinetics
of X-irradiated mouse L-cells studied with
time lapse photography.
Intern. J. Radiation Biol. 15, 347 (1969)
50. TOPLIN, J.: A tissue culture cytotoxicity test for large-
scale cancer chemotherapy screening.
Cancer Res. 19, 959 (1959)
51. TOPLIN, J.: Experiences with tissue culture system in
large-scale cancer chemotherapy screening.
Cancer Res. 21, 1042 (1961)

52. VAINIO, T., KOSKIMIES, O., PERLMANN, P., PERLMANN, H.
und KLEIN, G.: In vitro cytotoxic effect
of lymphoid cells from mice immunized with
allogenic tissue.
Nature 204, 453 (1964)
53. VOLM, M., KAUFMANN, K., HINDERER, H. und GOERTTLER, K.:
Schnellmethode zur Sensibilittstestung
maligner Tumoren gegenüber Cytostatika.
Klin. Wschr. 48, 374 (1970)
54. VOLM, M., KAUFMANN, M., MATTERN, J. und WAYSS, K.:
Sensibilittstestung von Tumoren in vitro:
Untersuchungen zur Methodik, Individualität
der Tumoren und einer In-vivo-in-vitro-
Korrelation.
in: WÜST, G. P. (Hrsg.): Aktuelle Probleme
der Therapie maligner Tumoren (Georg Thieme
Verlag Stuttgart, 56-72 (1973)
55. VOLM, M., KAUFMANN, M., MATTERN, J. and WAYSS, K.:
Sensitivity tests of tumors to cytostatic
agents. I. Comparative investigations on
transplanted tumors in vivo and in vitro.
Z. Krebsforsch. 83, 85-96 (1975)
56. WHITMORE, C. F. and TILL, J. E.: Quantitation of cellular
radiobiological responses.
Ann. Rev. Nucl. Sci. 14, 347 (1964)

57. WOLBERG, W. H. and BROWN, R. R.: Autoradiographic studies of in vitro incorporation of uridine and thymidine by human tumor tissue. Cancer Res. 22, 1113 (1962)
58. WRIGHT, J. C., COBB, J. P., GUMPORT, S. L., COLOMB, F. M. and SAFADI, S.: Investigation of the relation between clinical and tissue-culture. Response to chemotherapeutic agents on human cancer. New Engl. J. Med. 257, 1207 (1957)

LEBENS LAUF

Als Sohn der Eheleute Charalampos und Panagiota Palaras wurde ich am 23. 11. 1951 in Anixis/Griechenland geboren.

Nach sechsjährigem Besuch der Volksschule in Griechenland kam ich 1963 in die Bundesrepublik Deutschland.

1972 legte ich in München meine Reifeprüfung am Klenze-Gymnasium (Mathematisch-naturwissenschaftliches Gymnasium) ab. Anschließend studierte ich ein Semester Physik an der Ludwig-Maximilians-Universität in München.

1973 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Universität in Heidelberg, setzte das weitere Studium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München fort und bestand hier mein Staatsexamen in Medizin 1979.

